



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE ESTOMATOLOGIA

Título

**“EFECTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE
Azadirachta indica (NEEM) SOBRE LA
VIABILIDAD *IN VITRO* DE *Streptococcus mutans*
ATCC 25175”**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE CIRUJANO
DENTISTA**

AUTOR:

WILMER JUNIOR CANO URTEAGA

ASESOR:

M. SC. MIGUEL ANGEL RUIZ BARRUETO

LINEA DE INVESTIGACIÓN:

FITOTERAPIA EN ESTOMATOLOGÍA

PIURA-PERU

2017

PÁGINA DEL JURADO

Mg. CD. Wilfredo Terrones Campos
Presidente

Mg. CD. Dora Denisse Cruz Flores
Secretario

M.Sc. Mblgo. Miguel Angel Ruiz Barrueto
Vocal

DEDICATORIA

El objetivo de ser un profesional en mi vida está orientado a brindar el bien hacia los demás y Dios me da la fortaleza para poder realizarlo.

Dedico este gran logro a Dios por haberme permitido llegar hasta donde estoy.

A mis padres y mi hermano por sus consejos oportunos, por su apoyo y amor incondicional y permanente, por su esfuerzo para poder lograr ser una gran persona con valores y lograr mis metas hacia el futuro.

AGRADECIMIENTOS

Debo agradecer de manera especial y sincera a mi asesor por haberme ayudado en todo momento para poder culminar con éxito la presente tesis.

Quiero expresar también mi más sincero agradecimiento a la Universidad Cesar Vallejo – Filial Piura por haberme dado las bases teóricas y prácticas para convertirme en un buen profesional.

DECLARATORIA DE AUTENTICIDAD

Yo, **Wilmer Junior Cano Urteaga**, identificado con **DNI N° 70376249** estudiante de la Escuela Profesional de Estomatología, Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad César Vallejo, presento la tesis titulada “EFECTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Azadirachta indica* (NEEM) SOBRE LA VIABILIDAD *IN VITRO* DE *Streptococcus mutans* ATCC 25175” y Declaro bajo juramento que:

1. La tesis es de mi autoría.
2. He respetado las normas internacionales de citas y referencias para las fuentes consultadas. Por tanto, la tesis no ha sido plagiada ni total ni parcialmente.
3. La tesis tampoco ha sido autoplagiada; es decir, no ha sido publicada ni presentada anteriormente para obtener algún grado académico previo o título profesional.
4. Los datos presentados en los resultados son reales, no han sido falseados, ni duplicados, ni copiados y por tanto los resultados que se presenten en la tesis se constituirán en aportes a la realidad investigada.
5. De identificarse algún tipo de fraude (datos falsos), plagio (información sin citar a autores), autoplagio (presentar como nuevo algún trabajo de investigación propio que ya ha sido publicado), piratería (uso ilegal de información ajena) o falsificación (representar falsamente las ideas de otros), asumo las consecuencias y sanciones que de mi acción se deriven, sometiéndome a la normatividad vigente de la Universidad César Vallejo.

Piura, 17 de julio del 2017

Wilmer Junior Cano Urteaga
DNI N° 70376249

PRESENTACIÓN

Señores miembros del Jurado:

Pongo a su consideración la tesis titulada: EFECTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Azadirachta indica* (NEEM) SOBRE LA VIABILIDAD *IN VITRO* DE *Streptococcus mutans* ATCC 25175 en cumplimiento del Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad César Vallejo para obtener el Título Profesional de Cirujano Dentista.

El objetivo de esta investigación es la búsqueda de alternativas de control antibacteriano frente a bacterias de interés estomatológico como lo es *Streptococcus mutans*. La presente tesis está distribuida en seis capítulos según formato establecido por la Jefatura de Investigación de la Universidad César Vallejo – Filial Piura.

Espero sus oportunas sugerencias para mejorar la calidad de la presente tesis de tal manera que pueda contar con su aprobación para su sustentación y defensa.

El autor.

ÍNDICE

PÁGINA DEL JURADO	2
DEDICATORIA.....	3
AGRADECIMIENTOS	4
DECLARATORIA DE AUTENTICIDAD	5
PRESENTACIÓN	6
ÍNDICE	¡Error! Marcador no definido.
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
I. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1 Realidad Problemática	11
1.2 Trabajos previos	14
1.3 Teorías relacionadas al tema	18
1.4 Formulación del problema.....	26
1.5 Justificación del estudio	26
1.6 Hipótesis	26
1.7 Objetivos	27
1.7.1 Objetivo General	27
1.7.2 Objetivos Específicos.....	27
II. MÉTODO.....	27
2.1 Diseño de investigación	27
2.2 Variables, Operacionalización.....	28
2.3 Población y muestra.....	29
2.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad	30
2.5 Métodos de análisis de datos.....	34
2.6 Aspectos éticos	34
III. Resultados	35
IV. DISCUSIÓN	40
V. CONCLUSIONES.....	42
VI. RECOMENDACIONES	43
VII. REFERENCIAS.....	44
ANEXOS	47

RESUMEN

Se determinó el efecto *in vitro* del extracto etanólico de *Azadirachta indica* (NEEM) sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. La evaluación consistió en el enfrentamiento de un inóculo estandarizado de *S. mutans* frente a 10 concentraciones volumétricas del extracto las cuales fueron 1000 µg/mL, 2000 µg/mL, 3000 µg/mL, 4000 µg/mL, 5000 µg/mL, 6000 µg/mL, 7000 µg/mL, 8000 µg/mL, 9000 µg/mL y 10000 µg/mL, un control positivo que fue gluconato de clorhexidina al 0,12% y el control del solvente de extracción que fue etanol al 80%. Se utilizaron dos métodos de evaluación, el método de discodifusión para evaluar el efecto antibacteriano y para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) se utilizó el método de microdilución en caldo. La lectura de los resultados para el método de difusión en disco se realizó mediante la medición del diámetro de los halos de inhibición y se reportó en milímetros. Por el método de microdilución se realizó la medición en el programa LASEZ Leica y se reportó en µm de diámetro de botón. Se determinó que tanto la CMI como la CMB estuvieron por debajo de la concentración de 1000 µg/mL. La mayor inhibición se encontró a la concentración de 9000 µg/mL. Experimentalmente se comprobó que el extracto etanólico de NEEM tiene efecto inhibitorio sobre *S. mutans* ATCC 25175 pero estadísticamente se demostró que no había significancia respecto al control positivo $p < 0.05$. Se presume que el efecto inhibitorio del extracto observado experimentalmente se pudo deber a los compuesto fenólicos presentes en las hojas de la planta cuyos efectos antibacteriano se han sustentado en investigaciones previas. Se concluye que el extracto alcohólico de *Azadirachta indica* (NEEM) tiene efecto inhibitorio *in vitro* sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 pero dicha inhibición cuando se compara con el control positivo gluconato de clorhexidina al 0.12% no es estadísticamente significativa.

Palabras claves: Antibacteriano, *Streptococcus mutans*, *Azadirachta indica* (NEEM).

ABSTRACT

The *in vitro* effect ethanol extract from *Azadirachta indica* (neem) on *Streptococcus mutans* ATCC 25175. The evaluation was determined in the confrontation of a standardized inoculum of *S. mutans* against 10 volume concentrations of the extract which were 1000 g / mL, 2000 mcg / mL, 3000 mg / mL, 4000 mg / mL, 5000 mg / mL, 6000 mg / mL, 7000 mg / mL, 8000 mg / mL, 9000 mg / mL and 10,000 ug / mL, a positive control was gluconate Of chlorhexidine 0.12% and control of the extraction solvent which was 80% ethanol. Two methods of evaluation were used, the method discodifusión to assess the antibacterial effect and to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) the broth microdilution method was used. The reading of the results for the disc diffusion method was performed by measuring the diameter of the inhibition halos and was reported in millimeters. By the microdilution method, the measurement was performed in the LASEZ Leica program and reported in μm of button diameter. It was determined that both the MIC and the CMB were below the concentration of 1000 μg / mL. The highest inhibition was found at the concentration of 9000 μg / mL. Experimentally found that the alcoholic extract of NEEM has inhibitory effect on *S. mutans* ATCC 25175 but statistically it was demonstrated that there was no significance regarding the positive control $p < 0.05$. It is presumed that the inhibitory effect of the extract observed experimentally could be due to the phenolic compounds present in the leaves of the plant whose antibacterial effects have been sustained in previous investigations. It is concluded that the ethanol extract of *Azadirachta indica* (neem) has *in vitro* inhibitory effect on *Streptococcus mutans* ATCC 25175pero said inhibition when compared with the positive control chlorhexidine gluconate 0.12% is not statistically significant.

Keywords: Antibacterial, *Streptococcus mutans*, *Azadirachta indica* (NEEM).

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad el Perú se encuentra considerado entre uno de los países más importantes del mundo debido a su gran biodiversidad. Se ha establecido que se encuentra ubicado entre los 17 países que cuentan con el 70% de la biodiversidad a nivel mundial por lo que es considerado miembro del grupo de Países Megadiversos¹. Debido a la riqueza vegetal con la cual cuenta el Perú, desde algún tiempo se vienen realizando investigaciones en los cuales se utiliza diversas plantas con fines medicinales. Principalmente en búsqueda de nuevos fármacos cuyos componentes bioactivos puedan ser evaluados de tal manera que se pueda determinar sus efectos en diferentes organismos.

Algunas de estas plantas medicinales han servido para el estudio sus componentes y propiedades. Estas investigaciones han determinado que muchas plantas distribuidas en el territorio nacional pueden actuar como antiinflamatorios, analgésico, antibacterianas, entre otras propiedades. En el área de odontología, diversas plantas han sido utilizadas en distintas etapas como por ejemplo en la etapa preventiva empleando aditivos en distintos productos que existen para nuestra higiene oral con propiedades contra la halitosis, anti-inflamatorios y antibacterianos².

Se puede afirmar que el uso de las plantas medicinales se desarrolló conjuntamente con el hombre, desde la prehistoria hasta inicios del siglo XIX se emplearon por ensayo error, aquellos extractos que facilitaban remediar enfermedades, esta técnica ha pasado de generación en generación y ha ido mejorando tanto que actualmente se considera una disciplina de la medicina denominada "Medicina Tradicional"³. El empleo de extractos de plantas y fitoquímicos con propiedades antibacterianas conocidas puede ser de gran importancia en los tratamientos terapéuticos. Según la organización Mundial de la Salud (OMS) en los últimos años, un gran número de estudios han sido realizados en diferentes países para probar la eficiencia de los productos vegetales frente a una serie de microorganismos patógenos³.

La *Azadirachta indica* (Neem), es un árbol perenne de origen Indio, se ha adaptado y desarrolla muy bien en zonas que su clima sea tropical o también subtropical. Algunos estudios establecen que esta planta tiene propiedades insecticidas, antibacterianas, medicinales, y actividad farmacológica, y son estas características las que han servido para que diversos países intenten importarla y así poder aprovechar sus propiedades para beneficio de la sociedad⁴.

En la presente investigación se evaluó el efecto que posee el extracto etanólico de *Azadirachta indica* (Neem) sobre la viabilidad *in vitro* de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Los resultados obtenidos permitieron establecer de forma más clara la utilidad de esta planta como fármaco para controlar bacterias de interés estomatológico por lo que dichos resultados servirán como base para el desarrollo de otras investigaciones en este campo, considerando que es una planta muy bien adaptada a la Región Piura y es de fácil acceso para la población.

1.1 Realidad Problemática

En tiempos ancestrales, la población tiene el conocimiento y creencia que algunas plantas poseen propiedades curativas que benefician a la salud y contribuyen en el tratamiento de algunas Enfermedades.¹ En el Perú esto es una realidad. Es bien sabido que muchas prácticas actuales en salud se fundamentan en conocimientos culturales que la población se ha transmitido de generación en generación y que son efectivas para determinados procesos.

En los últimos años el Perú se encuentra incluido entre los 17 países de gran diversidad de la Tierra nombrados como “países megadiversos”. Su variedad vegetal comprende en un promedio de más de 30 mil especies detalladas y algunas de estas especies han sido seleccionadas a través de investigaciones que poseen propiedades medicinales¹.

Actualmente se han realizado estudios de gran importancia con el objetivo de conocer el efecto que presenta en la salud de sus probables composiciones bioactivas existentes en las plantas y es probable afirmar que hay más información sobre sus propiedades medicinales, funcionales y toxicológicas².

El reto en la actualidad de los países megadiversos es tratar de vincular y transformar el conocimiento procedente de los recursos biológicos en compuestos, procesos, métodos, herramientas o artículos beneficiosos como parte de la producción para el beneficio de la sociedad³.

En el Perú en la actualidad se han elaborado varios estudios con distintas especies de plantas medicinales que han confirmado las propiedades de sus componentes y las han catalogado como antibacterianas, antihemorrágicas, analgésicas, antiinflamatorias, entre otras².

La región Piura tiene diversidad de plantas que su población considera que tiene propiedades medicinales para controlar microorganismos, una de ellas es la *Azadirachta indica* (NEEM), planta silvestre no endémica pero muy bien adaptada, que crece en toda la región Piura y que no posee muchos requerimientos especiales para su cultivo. Es un árbol de desarrollo rápido, robusto, hoja perenne, de color verde y frondoso^{4, 5}.

En relación con la Estomatología, diversas plantas se han utilizado en el aspecto preventivo y muchos de sus componentes son aplicados como aditivos en distintos productos de higiene oral. Esta realidad también nos indica que, si bien es cierto, la región Piura posee muchas plantas con propiedades farmacológicas comprobadas no existen investigaciones en las cuales se demuestre el efecto de los extractos vegetales de plantas de nuestra región².

Desde los inicios de la historia humana se ha generado información cultural de los campesinos ancestrales en el cual se explica el aprovechamiento y

beneficio de *Azadirachta Indica* (Neem) sus propiedades catalogadas como medicinales. En la Antigüedad los herbolarios hindúes descubrieron las propiedades del Neem y su uso se encuentra documentado desde hace 4000 años. Se sabe que lo emplearon para muchos fines medicinales como para tratar muchas enfermedades y calmar dolencias. Dicha planta es conocida como la “farmacia de la aldea” o también como la “botica del pueblo”⁴.

En la actualidad el uso de extractos de plantas y fitoquímicos con propiedades antibacterianas son de mucha importancia en la terapia farmacológica de distintas enfermedades. Estudios han sido realizados en diferentes países para probar tal eficiencia. Según la organización Mundial de la Salud (de ahora en adelante OMS), las plantas medicinales conforman la mejor fuente para la obtención de una variedad de fármacos que pueden ser industrializados. Por otra parte, se ha determinado que el 90% de las personas, en las ciudades industrializadas están siendo afectadas por infecciones órales de tipo bacteriano. Así mismo se ha concluido que la mayoría de éstos emplean productos químicos para el control de tales afecciones^{6, 7}.

La caries dental es una de las enfermedades orales más prevalentes en Piura, prevalencia que también se repite a nivel nacional e internacional⁸. Tiene origen multifactorial que se caracteriza por la desmineralización de la superficie dental causada por bacterias adheridas a la misma, cuyo microorganismo más prevalente es el *Streptococcus mutans*¹.

La población de Piura según el Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI) está catalogada de recursos económicos bajos⁹. Dicho índice demuestra que la salud oral de la población es deficiente, por ello los altos índices de caries. Esta situación puede estar relacionada no solo al nivel socioeconómico de la población y su difícil acceso a los programas de salud oral, si no a la utilización de productos orales realmente efectivos

contra la caries, hablamos pues de colutorios, enjuagues, pastas dentales o quimioterapia.

La utilización de productos vegetales con actividad farmacológica comprobada para controlar microorganismos de interés estomatológico como lo es el *S. mutans* es el aporte que como futuros profesionales Cirujanos Dentistas deberíamos promover, no solo para proporcionar productos naturales de fácil acceso para la población sino para revalorar nuestros recursos regionales en bien de la salud oral y económica de la población Piurana.

1.2 Trabajos previos

López G. (2014). En su investigación titulada “Evaluación *in vitro* del efecto antibacteriano de la *Camellia sinensis* (té verde) frente al *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y al *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556)” tuvo como objetivo evaluar *in vitro* el efecto antibacteriano de la *Camellia sinensis* (té verde) frente al *S. mutans* (ATCC 25175) y al *S. sanguinis* (ATCC10556). Para lo cual se probaron dos extractos de té verde, uno comercial y otro a granel y se utilizaron 24 discos para el primer extracto y la misma cantidad para el segundo extracto metanólico. Se aplicó el método de difusión en agar con discos y los halos de inhibición se midieron a las 72 horas. Se encontró que el promedio del halo de inhibición para el extracto de té verde comercial fue de 19.72 mm y para el extracto de té verde a granel fue de 18.1 mm frente al *S. mutans*, mientras que para el *S. sanguinis* la media obtenida fue de 17.94 mm y 16.46 mm respectivamente. Se concluye que ambos extractos metanólicos de té verde presentaron efecto antibacteriano pero té verde comercial fue el que presentó mayor efecto antibacteriano⁸.

Bussman R. (2010). En la investigación “Actividad antibacterial de plantas medicinales del norte del Perú” concluyó que el extracto etanólico de *Prosopis Pallida* presenta actividad antibacteriana sobre la cepa de

Staphylococcus aureus debido a que produjo un halo de inhibición de 15 mm de diámetro. Luego, en el año 2011, determino que los extractos acuosos y alcohólicos de *Prosopis Pallida* mostraban baja toxicidad⁹.

Mustafa M. (2016) “Eficacia Antibacteriana de Neem (*Azadirachta indica*) Extracto contra *Enterococcus faecalis*: Un estudio in vitro”. Evaluar la eficacia in vitro antimicrobiana del extracto de neem (*Azadirachta indica*) contra *Enterococcus faecalis*. Metodología: Se utilizaron extractos de hojas de neem, clorhexidina al 2%, hipoclorito de sodio al 3% para evaluar la eficacia antimicrobiana. Se utilizó la prueba de difusión de pocillo de agar para estudiar la eficacia antimicrobiana con solución salina como control. La zona de inhibición se registró, se tabuló y se analizó estadísticamente con la ayuda de IBM Statistical Package para las Ciencias Sociales versión 20 utilizando el análisis de la prueba de varianza. Todos los tres medicamentos mostraban zonas bien definidas y comparables de inhibición alrededor de sus pocillos respectivos. Todos los valores fueron significativamente más altos que el grupo control. El análisis de varianza mostró diferencias significativas entre los diámetros de la zona de clorhexidina, extracto de hoja de neem y hipoclorito de sodio al 3% contra *E. faecalis* ($p < 0,05$). Conclusión: el extracto de hoja de neem muestra zonas comparables de inhibición con las de clorhexidina e hipoclorito de sodio¹⁰.

Wolinsky L. (1996) “El efecto inhibidor del extracto acuoso *Azadirachta indica* (Neem) sobre las propiedades bacterianas que influyen en la formación de placas in vitro” Examinar los efectos inhibitorios de los extractos acuosos derivados de los bastoncillos (palo de Neem) de *Azadirachta indica* sobre la agregación bacteriana, el crecimiento, la adhesión a la hidroxiapatita y la producción de glucano insoluble, que pueden afectar a la placa in vitro formación. Metodología: Se examinaron extractos de palo de neem para detectar la inhibición mínima del

crecimiento bacteriano (MIC) contra un panel de estreptococos por medio de un ensayo de dilución en caldo, el efecto del extracto de palo de Neem sobre la síntesis de glucano insoluble se midió mediante la captación de glucosa radiomarcada a partir de sacarosa ^{14}C . Resultado: El pretratamiento de la hidroxiapatita condicionada por saliva con el palo de Neem o el extracto rico en galotanina antes de la exposición a bacterias produjo reducciones significativas en la adhesión bacteriana. El extracto de palo de Neem y el extracto enriquecido con gallotannina de *Melaphis chinensis* inhibieron la síntesis de glucano insoluble. Conclusiones: Estos datos sugieren que el extracto de palo de Neem puede reducir la capacidad de algunos *estreptococos* para colonizar las superficies de los dientes¹¹.

Purga T. (2013) "Efectividad antibacteriana "in vitro" del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) sobre flora salival" Objetivo: Determinar el efecto antibacteriano "in vitro" de diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) sobre flora salival. Resultado: se encontraron halos de inhibición mayores a 9,5 mm con diámetros promedios que varían entre 12,47 a 20,56 mm y se observa que los diámetros de los halos aumentan según aumente la concentración del extracto de romero, se encontró como máximo halo de inhibición 32 mm; estos resultados se decidió comparar con un control positivo clorhexidina al 0.12% que generalmente se usa como antiséptico oral, y un control negativo agua destilada, encontrándose que los halos de inhibición obtenidos por EERO de 50 mg/ml y 75 mg/ml, fueron mayores que los obtenidos por los grupos controles clorhexidina 0.12% y agua destilada. Conclusiones: El extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* tiene efecto antibacteriano sobre la flora bacteriana salival. Los valores de los halos de inhibición se encuentran entre los valores límite y sumamente sensible: nula (-) si fue inferior o igual a 8 mm; sensibilidad límite (+) de 9 a 14 mm; sensibilidad media (++) de 15 a 19 mm y sumamente sensible (+++) si fue igual o superior a 20 mm¹².

Torres J., (2014) "Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de *Luma chequen* (molina) a. gray "arrayán" frente a patógenos aislados de hemocultivos del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen, Lima - Perú." Objetivo: Evaluar la actividad antimicrobiana de extractos hexánico, diclorometánico, etanólico y acuoso de *Luma chequen* (Molina) A. Gray "arrayán" frente a patógenos bacterianos y fúngicos de origen hospitalario. El extracto etanólico de *Luma chequen* "arrayán" presentó la mayor actividad antimicrobiana frente a cepas patógenas de referencia, así como a patógenos Gram positivas, Gram negativas y levaduras, aislados de origen hospitalario en comparación con los extractos de hexano y diclorometano que no mostraron actividad inhibitoria significativa. El extracto acuoso no mostró efecto antifúngico, sin embargo sobre algunos patógenos bacterianos presentó un mediano poder inhibitorio. *Luma chequen* "arrayán" posee principios activos con acción antimicrobiana, hecho corroborado por los valores CMI, lo cual contribuye al fortalecimiento y credibilidad de los conocimientos ancestrales¹³.

Huari G., (2014) "Efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) en *Streptococcus mutans*" Objetivo: Valorar efecto antibacteriano del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Muña) en *Streptococcus mutans*. El aceite esencial de *Minthostachys mollis* al 100 %, presentó mayor efecto antibacteriano en *Streptococcus mutans* con un halo promedio de 10.79 mm, comparado con las diluciones al 50 % y 25 %. Según la escala de Duraffourd, el aceite esencial de *Minthostachys mollis* al 100 % presentó actividad sensible (+) en *Streptococcus mutans*. El control positivo (amoxicilina 25 ug) presentó mayor halo de inhibición promedio de 40.3 mm, comparado con el aceite esencial de *Minthostachys mollis* al 100 % cuyo promedio fue 10.79 mm, lo que indica comparado con este control presentó menor efecto antibacteriano contra *Streptococcus mutans*¹⁴.

Abanto V. en la investigación denominada “Efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de *Caesalpinia Spinosa* (TARA) sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175” Objetivo: determinar el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* (Tara) frente a cepas de *Streptococcus mutans*. Obtuvo como mediante el método de dilución en tubos que ésta especie presenta efecto antibacterianos a las concentraciones de 40%, 60% y 80%, mostrándose un mayor halo de inhibición al 80% (14.8mm) y la concentración mínima inhibitoria de 40%. Conclusiones: El extracto etanólico de vainas de *Caesalpinia spinosa* “tara” posee actividad antibacteriana in vitro sobre el crecimiento de cepas de *Streptococcus mutans*¹⁵.

1.3 Teorías relacionadas al tema

1.3.1 Fitoterapia

El uso de las plantas medicinales, es algo que se ha dado desde hace mucho tiempo y son base de conocimiento de las sociedades humanas. Nuestros antepasados se vieron en la necesidad de distinguir las plantas venenosas y las que no eran, así descubriendo el poder de aquellas plantas que no era venenosas, que algunas poseían propiedades medicinales. En el reino vegetal se encuentran muchas especies de plantas que poseen sustancias medicinales y que también aún están por descubrir. La mayor parte de las especies son estudiadas para hallar sus propiedades medicinales, estrogénicas, antipiréticas, antihelmínticas, astringentes, fungicidas, antibióticas¹⁷.

En la actualidad se utiliza la terapia medicinal para poder enfrentar efectos colaterales de algunas patologías, se sugiere como una medicina alternativa¹⁸. La efectividad antibacteriana está determinada como la condición de generar la muerte de una bacteria por alguna sustancia, es decir genera la lisis de las bacterias¹⁹.

1.3.2 Plantas medicinales

Es un grupo amplio de vegetales, que forman principios activos, que es una sustancia que realiza una acción farmacológica, tanto como pudiendo llegar a beneficiar o perjudicar al ser humano. Se puede utilizar como una droga o medicamento, logrando aliviar la enfermedad o recuperar la salud perdida¹⁶.

1.3.3 *Azadirachta indica* (Neem)

Es una planta con un gran espectro de acción. En los últimos años, se han aislado 25 principios activos diferentes de este vegetal. Pertenece a la familia *Meliaceae*, es un árbol grande, que se caracteriza por tener un tronco recto y corto con hojas largas y pinadas. Las flores son ramificadas y miden de 5 a 15 cm de largo, las flores individuales presentan 5 lóbulos redondos y de color pálido. Sus frutos son pequeños de 1.0 a 2.0 cm de largo, de color amarillo cuando madura²⁰.

Actualmente se encuentra distribuido en más de 78 países, en el continente Asiático, Africano, Oceanía, Centro y Sur de América. Se tiene una probabilidad que en la actualidad en el mundo existe un aproximado de 200 millones de árboles, gran parte de estos se encuentran en Asia, donde se desarrollan bajo cultivo y de manera silvestre y también en la India⁴.

El árbol del Neem fue nombrado científicamente como *Azadirachta indica*, y corresponde a la familia *Meliaceae*, que también pertenecen algunas plantas como el “cedro”, la “caoba”, el “paraíso” (piocha o canelo). Su clasificación del Neem fue descrita por Baley, 1977: Pertenece al Reino: vegetal, Subreino: Trachaeophyta, División: Embriofitas, Subdivisión: Angiospermas, Clase: Dicotiledónea, Orden: Geraniales, Familia: *Meliaceae*, Género: *Azadirachta* y Especie: *Azadirachta indica*.

1.3.4 Microorganismos orales

Las personas comparten el ambiente con una multitud de microorganismos, aunque además aloja en su interior gran cantidad de gérmenes. Por consiguiente para que se produzca una patología requiere algunas causas como: la condición del microorganismo, la condición del hospedador y por último la condición del ambiente en que se encuentra. La cavidad oral se estima un ambiente y sus propiedades generan la formación y la función de los microorganismos que se hallan en la cavidad oral. El lugar donde los microorganismos se desarrollan es el hábitat ²¹.

La cavidad oral aloja una cantidad ilimitada de microorganismos, hasta hace un cierto tiempo la cavidad oral se pensaba que era un hábitat sencillo para los microorganismos, pero en el presente se identifica que la lengua, el surco gingival, los dientes, la saliva y otras superficies de la mucosa oral generan hábitats o en lugares distintos donde los microorganismos se desarrollan con éxito. El hábitat en el que se encuentran los microorganismos se genera una población con cierta cantidad ilimitada de especies microbianas diferentes, que pueden integrarse o luchar contra otras en la misma población, entonces la flora bucal es una sociedad perjudicada por muchas alteraciones en el tiempo de vida del huésped²¹.

El grupo de varios microorganismos con algunas partes del organismo es nombrada con varios términos como: flora autóctona, flora indígena, flora normal, flora residente y asociación microbiana, el papel que cumple esta flora normal en la cavidad oral es muy empeñoso, ya que cumple un papel de gran importancia en los mecanismos de defensa local de la mucosa, evitando la propagación e invasión por microorganismos más patógenos²².

Se piensa que la diversidad de microbiota oral del adulto es talvez su principal característica. Las distintas interacciones ecológicas que se

producen en la en la flora bucal son las que precisan las propiedades cuali-cuantitativas de su microbiota total. Los microorganismos que constituyen la microbiota oral cohabitan en ambientes regulados por una serie de factores. La cantidad de placa dental puede ser variable y el grado de enfermedad periodontal estará en correlación al tipo y numero de microorganismos hallados.

Las lesiones cariosas y las restauraciones deficientes, insatisfactorias y que se encuentren en mal estado formaran y generaran ambientes adecuados para la acumulación de bacterias. Gran parte de los exámenes y estudios de la flora bucal del adulto, demuestran que hay cambios notables entre las personas, el número total de bacterias, entonces si puede haber un cambio de los resultados de una misma persona si se toman muestras en distintos tiempos²³.

Sin embargo la cavidad oral del feto en el útero se halla libre de gérmenes. Desde el nacimiento la cavidad oral queda expuesta a la microbiota del tracto vaginal materno. Los microorganismos que habitan al recién nacido desde las 8 horas de haber nacido conforman la comunidad pionera. Los primeros en instalarse son los estreptococos, en la mucosa, lengua y libres en la saliva. También pueden reconocerse otros géneros: estafilococos, lactobacilos, neumococos, coliformes, sarcinas, Neisseria, Haemophilus y candida albicans y el que suele aparecer de manera continua es *S. salivarius*²³.

La cavidad oral cambia a partir de los 6 meses de vida, tiempo en el cual ocurre la erupción de piezas dentarias primarias. Mucho de los microorganismos mencionados se ubican normalmente en sitios particulares como labios, dorso de la lengua, paladar duro, otros tejidos blandos, surco gingival y dientes. La acumulación de estas bacterias, por lo general se reduce a un solo sitio en la cavidad oral, probablemente debido a la interacción, de los mecanismos de retención y desprendimiento²¹.

1.3.5 Streptococcus mutans

Genero *Streptococos*: Son cocos Gram positivos, aerobios como también tienen la posibilidad de desarrollarse en condiciones anaerobias. Manifiestan metabolismo fermentativo y producen especialmente ácido láctico. *Streptococos Viridans*: El grupo *Viridans* posee muchas especies de estreptococos, estos constituyen la microbiota normal del tracto respiratorio superior¹⁹.

El grupo de *Streptococcus viridans* lo integran *S. mitis*, *S. mutans*, *S. salivarius*. *S. sanguis* entre otros, son los elementos más frecuentes de la microbiota normal del aparato respiratorio alto y favorecen las condiciones normales de este sistema. Debido otros factores como traumatismos estos estreptococcus pueden llegar a circulación sanguínea y causar endocarditis. Un grupo de los *Streptococos viridans*, como el *Streptococos mutans* simplifica polisacáridos como dextranos o levanos desde la sacarosa y aportan en un alto nivel a la patogenia de la caries dental ¹⁹. Su hábitat Estas bacterias poseen fundamental en la cavidad oral, se colonizan e invaden superficies duras como blandas y son los microorganismos más abundantes en todos sus ecosistemas primarios, este grupo de microorganismos forma la producción de placa como la producción de caries²¹.

Streptococos Mutans, es capaz de producir enzimas llamadas glucosiltransferasas, su deber es quebrar los enlaces de la sacarosa y une los restos de glucosa entre ellos mismos para poder generar glucanos insolubles, con la misión es de poder ayudar como matriz pegajosa para que se unan otras bacterias. Cuando la unión se hace más resistente, las bacterias deterioran la sacarosa a ácidos, como el láctico que desmineraliza al diente, generando la cavidad que se encuentra en la caries dental¹⁹.

Los *Streptococcus Mutans* son una comunidad de especies bacterianas, tomadas en cuenta como serotipos de una sola especie. Aquellas bacterias se identifican por su amplitud de generar glucanos extracelulares desde la glucosa y también por su producción ácida que fueron examinados en estudios por animales y personas¹⁹.

El *Streptococcus mutans* miembro del grupo *Viridans*, es estimada como la especie más común aislada en la placa dentobacteriana, entonces por reconocer que el *Streptococcus mutans* es uno de los microorganismos fundamentales y más importantes para el inicio de la caries, se toman medidas a diseñar métodos de prevención para la eliminación o prevención de este microorganismo en la cavidad oral²¹.

1.3.6 Caries dental

La caries y la enfermedad periodontal inician con la aparición de una placa dentobacteriana previa. La Organización Mundial de la Salud (OMS) la define como una etiología bacteriana proliferativa con actividad enzimática y alta capacidad de adhesión a las superficies dentarias. Asocia esta enfermedad a la presencia de la bacteria *Streptococcus mutans* cuya capacidad bioquímica y metabólica lo constituyen en el agente etiológico principal en la formación de la caries dental y enfermedad periodontal^{23,24}.

Costerton define a la biopelícula como “una comunidad bacteriana inmersa en un medio líquido caracterizado por bacterias que se hallan unidas a un sustrato o superficie, o también otras que se hallan embebidas en una matriz extracelular generadas por ellas mismas y que muestran un fenotipo alterado en cuanto al grado de multiplicación celular o la expresión de sus genes”²³.

Está establecido que la formación de la lesión cariosa se produce en tres etapas diferentes, la primera conocida como lesión incipiente, la

cual genera cambios histológicos a nivel del esmalte, un segundo momento es el incremento de la desmineralización inicial hacia la unión amelodentinaria que puede darse dentro de la dentina, por lo tanto la fase final del progreso de la caries es la aparición de una lesión evidente caracterizada por una cavitación²⁵.

Para que la caries se forme, debe existir la asistencia de bacterias que sean generadoras o productoras de ácidos y un medio que evite que el ácido sea excluido del lugar donde se desarrolla la caries. La placa dentobacteriana realiza estas funciones mencionadas, brinda protección a las colonias bacterianas en un capullo de glucano para evitar que sea excluida, neutralizada o perturbada por los antimicrobianos que están ubicados o localizados en la saliva o que las personas ingieren²⁵.

El efecto antibacteriano se define como el desarrollo por medio del cual un agente inhibe o destroza al microorganismo infectante. Este agente deberá aparecer de manera activa; así mismo está obligado a llegar a concentraciones suficientes para que se le presente la ocasión de desempeñar su efecto²⁴.

Antibacteriano es un aspecto de un fármaco, de una esencia o de una acción que se aprovecha para poder combatir bacterias por medio de su inhibición y eliminación¹⁹.

1.3.7 Factores predisponentes de caries

Se consideran como factores que condicionan el desarrollo de caries el alto grado de infección por *Streptococcus mutans* y por lactobacilos. Así mismo contribuye también una experiencia anterior de caries, la falta resistencia del esmalte a la acidez e incapacidad total o parcial de remineralización. La dieta cariogénica y la mala higiene bucal. Baja capacidad *buffer* de la saliva procesos de xerostomía. Apiñamiento dentario moderado, severo, tratamiento ortodóntico y prótesis.

Anomalías del esmalte. Recesión gingival. Enfermedad periodontal y Factores sociales²⁶.

1.3.8 Etiología de la caries

La caries dental considerada una enfermedad multifactorial esta predispuesta por la presencia de biopelícula bacteriana que se incrementa en el ambiente oral debido a una serie de factores como la ingesta de alimentos calóricos y la falta o inadecuada higiene ²⁷. Las bacterias en este proceso muchas veces no son extrañas al huésped, sino que son comensales de la microbiota normal lo que hace innecesaria su eliminación. Por otra parte la alimentación es un proceso esencial en todas las funciones fisiológicas del organismo, por lo que no podemos suprimirla, pero si podemos adecuarla a los requerimientos propios de cada persona. Disminuir la ingesta de alimentos cariogénicos contribuye también a menguar la proliferación de bacterias potencialmente cariogénicas²⁷.

1.3.9 Extracto etanólico

Se define como extracto etanólico a una solución con olor particular, obtenida a partir de materia vegetal deshidratada, mediante maceración o percolación en contacto con alcohol etílico, seguida de la eliminación de dicho solvente por un procedimiento físico²⁸.

Pese a que la cavidad oral posee una flora mixta, se tiene conocimiento que la bacteria más resaltante es el *Streptococcus Mutans*, bacteria causante de la caries dental¹⁹. También sabemos que el *Streptococcus Sanguinis* es otro microorganismo que influye en la caries dental, del género *Streptococcus*, este microorganismo es el responsable de generar la placa dental, habita en la cavidad oral de los niños en el momento que presenta sus primeras erupciones dentales, estudios demostraron científicamente que es el microorganismo que se aloja en las superficies dentales limpias. Pese a ello el potencial cariogénico de esta bacteria es muy baja en comparación al *Streptococcus mutans* y

según estudios la unión de estos 2 microorganismos podrían beneficiar para la incidencia de caries²³.

1.4 Formulación del problema

¿Cuál es el efecto del extracto etanólico de *Azadirachta indica* (NEEM) sobre la viabilidad *in vitro* de *Streptococcus mutans* ATCC 25175?

1.5 Justificación del estudio

La presente investigación se fundamenta desde dos aspectos muy importantes. En primer lugar la búsqueda de productos de origen natural para nuestro caso preciso de productos vegetales o sus derivados con capacidad de eliminar o controlar a los microorganismos patógenos. Nuestro país es reconocido a nivel mundial por su gran diversidad natural principalmente de plantas muchas de las cuales – en estudios previos – se ha determinado tienen propiedades que durante el largo de la historia ha beneficiado a la población peruana. Plantas consideradas medicinales porque logran aliviar síntomas e inclusive en algunos caso curar enfermedades. Esta propuesta de utilizar nuestros recursos forestales como la planta *Azadirachta indica* comúnmente conocida como NEEM para eliminar a *Streptococcus mutans*, principal agente etológico causal de caries dental es una idea avalada por la Organización Mundial de la Salud quienes conocedores de la problemática mundial de la resistencia bacteriana promueven el desarrollo de investigaciones para la búsqueda de antimicrobianos en plantas y siendo el NEEM una planta ornamental adaptada muy bien al territorio nacional y principalmente a la Región Piura es de fácil acceso para la población.

1.6 Hipótesis

El extracto etanólico de *Azadirachta indica* (NEEM) tiene efecto antibacteriano sobre la viabilidad *in vitro* *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

1.7 Objetivos

1.7.1 Objetivo General

Evaluar efecto del extracto etanólico de *Azadirachta indica* (NEEM) sobre la viabilidad *in vitro* de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

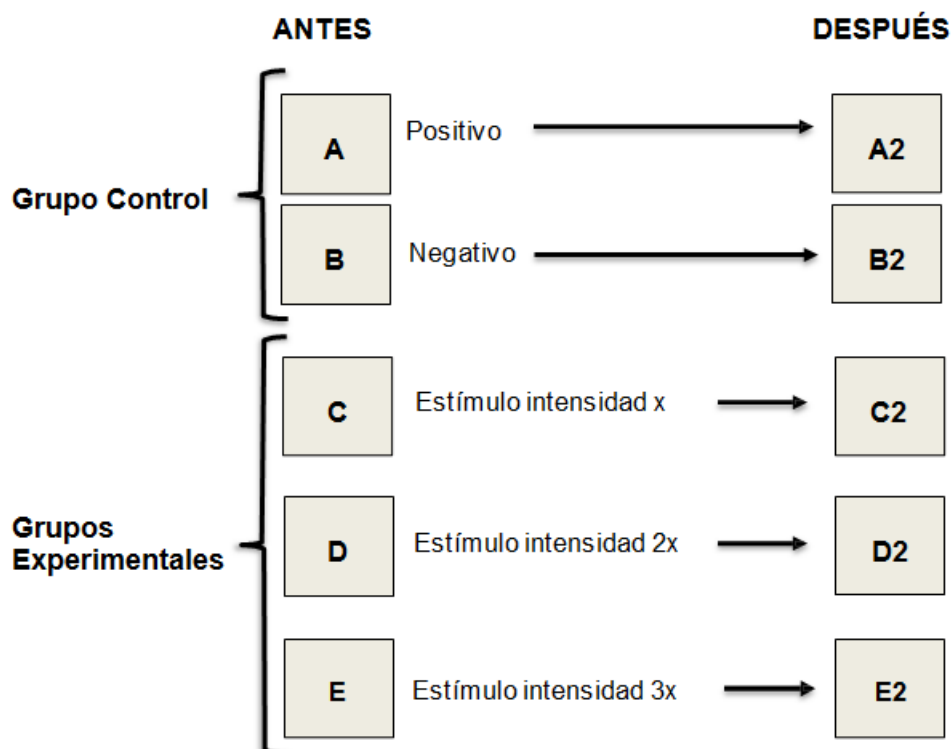
1.7.2 Objetivos Específicos

1. Determinar la concentración mínima inhibitoria del efecto del extracto etanólico de *Azadirachta indica* (NEEM) sobre la viabilidad *in vitro* de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.
2. Determinar la concentración mínima bactericida del efecto del extracto etanólico de *Azadirachta indica* (NEEM) sobre la viabilidad *in vitro* de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 Por el método de microdilución y el método de siembra en superficie
3. Determinar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Azadirachta indica* (NEEM) sobre la viabilidad *in vitro* de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 por el método de difusión en disco.

II. MÉTODO

2.1 Diseño de investigación

Investigación básica con diseño experimental de estímulo creciente.



2.2 Variables, Operacionalización

VARIABLES	DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	DIMENSION	INDICADORES	ESCALA DE MEDICIÓN
EFFECTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE <i>Azadirachta indica</i>	Capacidad de los extractos vegetales o de sus principios activos de inhibir temporal o indefinidamente el desarrollo bacteriano.	Determinación de la capacidad inhibitoria o antibacteriana de diferentes concentraciones del extracto total de <i>Azadirachta indica</i>	Diámetro del halo de inhibición Ausencia de botón	1000 µg/mL; 2000 µg/mL; 3000 µg/mL; 4000 µg/mL; 5000 µg/mL; 6000 µg/mL; 7000 µg/mL; 8000 µg/mL; 9000 µg/mL ; 10000 µg/mL	De razón
VIABILIDAD DE <i>Streptococcus mutans</i>	Capacidad de una bacteria de desarrollarse y reproducirse (duplicarse) en un ambiente natural o artificial incrementando su biomasa	Determinación de la capacidad de crecer en medio líquido formando botón o en medio sólido mediante UFC	UFC/mL. Diámetro de Botón mm	≥ 1 UFC/mL. ≥ 2 mm	De razón

2.3 Población y muestra

2.3.1 Población

La población estuvo constituida por una cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 proporcionada por el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo.

Por parte del vegetal utilizado la población estuvo constituida por hojas de la planta *Azadirachta indica* (NEEM) identificada a través de sus claves taxonómicas en el Herbarium Piurense de la Universidad Nacional de Piura.

2.3.2 Muestra

La muestra del estudio se obtuvo en el laboratorio a partir de la cepa proporcionada. Ésta estuvo constituida por 10 mL de una suspensión bacteriana a una concentración de 1.5×10^8 ufc/mL del cultivo puro de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

A partir del extracto vegetal total se prepararon las concentraciones de 1000 µg/mL; 2000 µg/mL; 3000 µg/mL; 4000 µg/mL; 5000 µg/mL; 6000 µg/mL; 7000 µg/mL; 8000 µg/mL; 9000 µg/mL; 10000 µg/mL del extracto etanólico de *Azadirachta indica* (NEEM).

2.3.3 Cálculo del número de duplicados

El número de replicados se determinó aplicando la siguiente fórmula estadística que es aplicable en investigaciones experimentales para determinar el número mínimo de observaciones, duplicados y repeticiones.

$$n = \frac{W - W^2 \cdot (Z_{\beta} + 1,4 \cdot Z_{\alpha})^2}{W^2}$$

Donde,

n = Número mínimo de muestras, observaciones o réplicas que deben efectuarse en el estudio.

$Z\alpha$ = Valor correspondiente al nivel de confianza asignado (Riesgo de cometer un error tipo I).

$Z\beta$ = Valor correspondiente al poder estadístico o potencia asignada a la prueba (Riesgo de cometer un error tipo II).

W = Rendimiento mínimo esperado, eficiencia mínima esperada o diferencia mínima observable. Así, $Z\alpha = 1.96$; $Z\beta = 0.842$; $W = 0.80$ (80%). Reemplazando la ecuación se obtuvo que el número mínimo de replicados a realizar es 9.

2.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad

2.4.1 Técnicas

Se realizara mediante la técnica de observación, donde el instrumento que se utilizara será una guía de observación en la cual se registraron los resultados obtenidos después de haber realizado los diferentes ensayos.

2.4.2 Instrumento de recolección de datos

El instrumento que se utilizó para la recolección de datos fue una ficha de recolección de datos.

2.4.1.1. Recolección de las hojas de *Azadirachta indica* (Neem)

Se recolectaron hojas de *Azadirachta indica* proveniente de la Provincia Piura del departamento de Piura y fueron trasladadas a la Universidad nacional de Piura para su identificación. Se seleccionaron las hojas de mejor calidad de la planta para su procesamiento en el laboratorio de biología de la Universidad César Vallejo, Piura. Perú.

2.4.1.2. Obtención del Extracto Etanólico de las hojas de *Azadirachta indica*

La metodología de extracción del extracto para la planta consistió en lo siguiente. Las hojas seleccionadas de *Azadirachta indica* fue de forma independiente fueron secadas en estufa a 50 °C durante 6 horas. Posteriormente se procedió a realizar la molienda del material vegetal seco en un molino artesanal hasta que se pulverizó todo el material. A partir del polvo obtenido se pesaron 150 g y se colocó en un frasco de vidrio de capacidad de 1000 mL cubierto con papel aluminio para proteger el preparado de luz, luego se le agregó el solvente extractor que consistió en etanol absoluto y se procedió a la obtención del extracto etanólico mediante el método de maceración en agitación constante durante siete días.

Después de los siete días de maceración el producto fue filtrado 3 veces, primero con papel filtro Whatman N° 41, y posteriormente con papel filtro Whatman N° 2 y N° 1 con lo que se obtuvo el extracto filtrado. Dicho extracto se llevó a sequedad en Rotavapor, obteniéndose el extracto seco de *Azadirachta indica* el cual fue pesado y colocado en viales cubiertos con papel de aluminio quedando listo para su uso.

2.4.1.3. Preparación de las concentraciones del extracto etanólico de hojas de *Azadirachta indica* (NEEM)

A partir del extracto seco de *Azadirachta indica* (Neem), se realizaron diluciones en una mezcla hidroalcohólica de etanol al 80% obteniéndose concentraciones de 1000 µg/mL; 2000 µg/mL; 3000 µg/mL; 4000 µg/mL; 5000 µg/mL; 6000 µg /mL; 7000 µg/mL; 8000 µg/mL; 9000 µg/mL; 10000 µg/mL. Cada concentración fue colocada en un vial estéril y tapado herméticamente y se mantuvo en refrigeración hasta el momento de su utilización.

2.4.1.4. Reactivación y comprobación de la Cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175

La cepa de *S. mutans* fue una cepa certificada fue proporcionada por el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Señor de Sipán y corroborada mediante pruebas bioquímicas y morfología microscópica en el Laboratorio de Biología de la Universidad César Vallejo – Filial Piura. Dicha bacteria se encontraba en cultivo puro refrigerado y fue reactivada sembrándose con asa bacteriológica en tubos de ensayo conteniendo medio tioglicolato y en tubos conteniendo caldo cerebro -corazón (según Merck) y se incubó en estufa a 37°C por 18 horas después de las cuales quedó liso para su utilización en los ensayos.

2.4.1.5. Preparación y estandarización del Inóculo bacteriano

La estandarización del inóculo se realizó mediante la técnica turbidimétrica. A partir del cultivo reactivado se realizará una suspensión en caldo Mueller Hinton hasta alcanzar una concentración bacteriana aproximada de $1,5 \times 10^8$ UF/mL, equivalente al tubo N° 0,5 del Nefelómetro de Mc Farland. La turbidez adecuada fue verificada usando un espectrofotómetro dónde se realizó la medición de la absorbancia a 625 nm la cual fue de 0.090 (el método recomienda que debe encontrarse entre 0.080 – 0.10). El inóculo preparado fue utilizado inmediatamente después de su preparación.

2.4.1.6. Métodos para la determinación de la sensibilidad antimicrobiana

La prueba de susceptibilidad antibacteriana se realizó mediante dos métodos recomendados por el CLSI (*Clinical and laboratory Standards institute*): El método de microdilución y el método de discodifusión.

2.4.1.6.1. Método de Discodifusión

A partir del inóculo estandarizado y con ayuda de una micropipeta de rango variable se extrajo 100 µL de la suspensión preparada y se depositó en placas con agar Mueller Hinton servidas previamente y secas en estufa 30 minutos antes de la siembra. La siembra de la cepa se realizó por hisopado. Inmediatamente después de la siembra se procedió a colocar en cada placa un disco de papel de filtro embebido en gluconato de clorhexidina al 0,12 % (control positivo), un disco de papel filtro embebido con Etanol al 80% (control del solvente), un disco de papel de filtro embebido con cada una de las concentraciones del extracto preparadas. Estos discos fueron colocados a una distancia aproximada de 25 mm entre ellos y a 1,5 cm. Las placas inoculadas y con los discos se llevaron a incubación a 36.5 °C durante 24 horas pasadas las cuales se procedió a realizar la lectura de los resultados mediante la medición de los halos de inhibición.

2.4.1.6.2. Método de microdilución

Este método fue utilizado para confirmar el efecto de las diferentes concentraciones de los extractos y para determinar la concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima bactericida. Se utilizó una microplaca estéril de 96 pocillos en U y con tapa. En cada uno de los primeros 10 pocillos se colocaron 100 µL de cada concentración de extracto, 100 µL de Gluconato de clorhexidina al 0,12% y sobre ellos 100 µL de la suspensión bacteriana estandarizada. El resto de pocillos verticales identificados desde la B a la H constituyeron replicaciones de los ensayos. Las microplacas inoculadas fueron incubadas a 36.5 °C durante 24 horas después de lo cual se realizará la lectura de los resultados. Para hallar la CMI (concentración mínima inhibitoria) y la CMB (concentración

mínima bactericida) se tomó 100 µL de suspensión a partir del pocillo donde no se observó desarrollo microbiano y se sembró en placas con agar Mueller Hinton incubándose estas durante 24 horas a 36.5 °C.

2.5 Métodos de análisis de datos

Los datos fueron recolectados en una ficha diseñada para ellos. Posteriormente dichos datos fueron tabulados en el programa Excel y analizados en el paquete estadístico SPSS. Se utilizó la prueba de Análisis de Varianza y el análisis de significancia así como la prueba de Duncan para comparar los diferentes bloques (Repeticiones del experimento).

2.6 Aspectos éticos

Se tuvo en cuenta la manipulación y eliminación del microorganismo utilizado que fue la bacteria *Streptococcus mutans* ATCC 25175, de acuerdo al manual de bioseguridad en el laboratorio de la Universidad César Vallejo. Así como a las consideraciones de eliminación de residuos biocontaminados recomendados por la Organización Mundial de la Salud y Organización Panamericana de la Salud.

III. Resultados

En la figura 1 se observa que el control negativo alcanzó un halo promedio de 8.2 mm, mientras que para el control positivo (Gluconato de clorhexidina) fue 16.5 mm. Con respecto a los halos promedios de los extractos se puede observar que todos muestran efecto inhibitorio pero la mayor inhibición se da en las concentraciones de 3000 µg/mL con un halo promedio de 15.5 mm y la concentración de 9000 µg/mL con un halo de inhibición promedio de 16.7 mm. El análisis de varianza arrojó variabilidad entre el efecto de cada concentración pero esta variación no fue significativa respecto a los controles evaluados. Como $F_w(0.05) < F_t(3.35)$, se acepta H_0 y se rechaza H_a . (Anexo 13).

La figura 2 muestra los resultados obtenidos por el método de microdilución se observa el desarrollo total alcanzado por la bacteria en el control de crecimiento y en las concentraciones de 1000 µg/mL, 2000 µg/mL, 3000 µg/mL, 4000 µg/mL, 5000 µg/mL, 6000 µg/mL, 7000 µg/mL, 8000 µg/mL 9000 µg/mL y 10000 µg/mL del extracto etanólico de *Azadirachta indica* (NEEM). Como se puede apreciar solo se observa crecimiento en el pocillo de control negativo (diámetro de botón 2200 µm) no se observa presencia de botón en ninguno de los pocillos, lo que indica que la inhibición fue total a partir de la primera concentración. Esto se comprobó realizando siembras en medios de cultivo a partir de los pocillos como se puede observar en la figura 3.

La Tabla 1 muestra los resultados obtenido en el método de microdilución se puede observar que solo en el control de crecimiento (concentración 0) se observa crecimiento bacteriano. En el resto de pocillos donde se incorporó tanto el inóculo bacteriano como los extractos el gluconato de clorhexidina al 0.12 % no se observa crecimiento alguno.

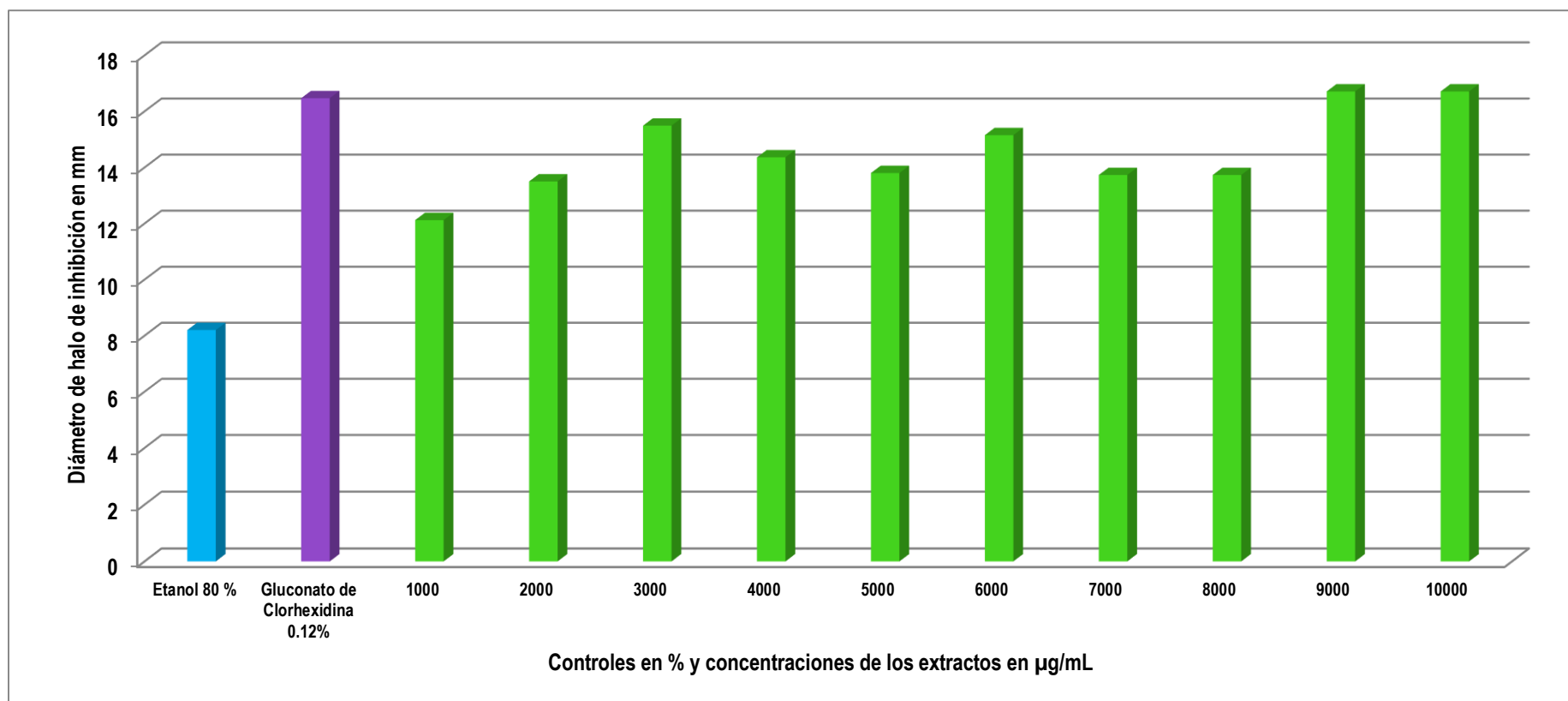


Figura 1. Promedios de diámetros de halo de inhibición de diez concentraciones del extracto alcohólico de *Azadirachta indica* (NEEM), etanol al 80% y Gluconato de Clorhexidina al 0.12% sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

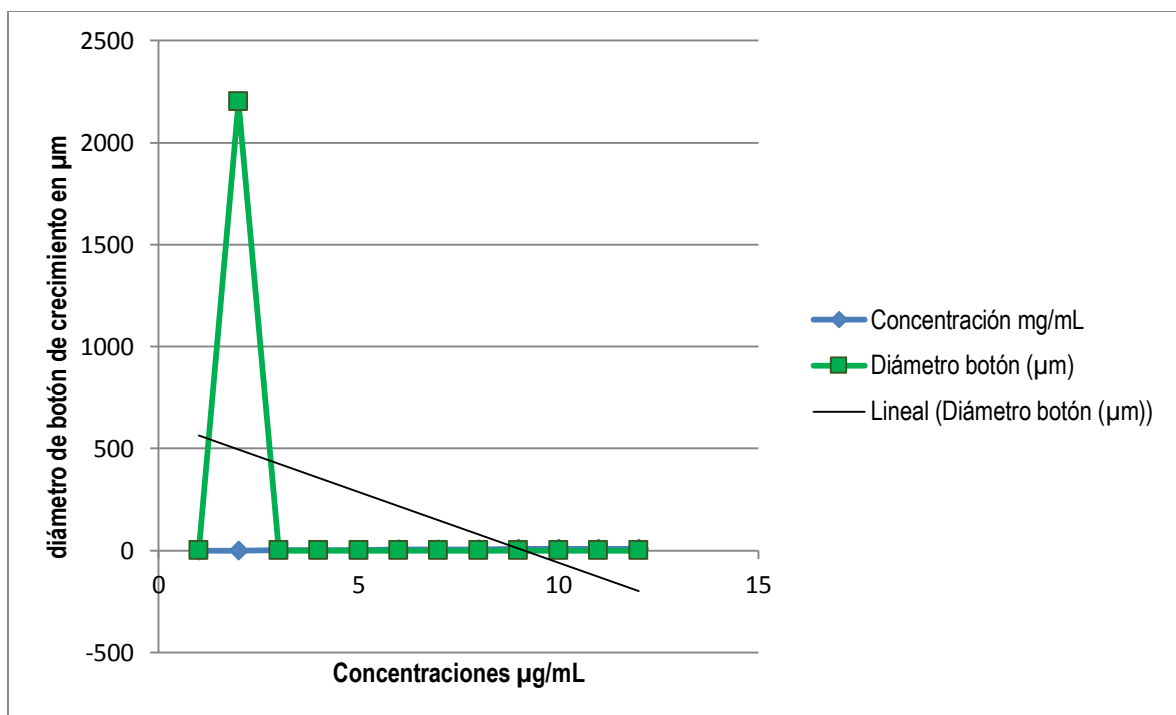


Figura 2. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) del extracto etanólico de *Azadirachta indica* (NEEM), etanol al 80% y Gluconato de Clorhexidina al 0.12% sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 mediante el método de microdilución.

Tabla 1. Diámetro de botón de crecimiento de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 frente a las concentraciones de 0 µg/mL, 1000 µg/mL, 2000 µg/mL, 3000 µg/mL, 4000 µg/mL, 5000 µg/mL, 6000 µg/mL, 7000 µg/mL, 8000 µg/mL 9000 µg/mL y 10000 µg/mL del extracto etanólico de *Azadirachta indica* (NEEM) y de Gluconato de clorhexidina al 0.12% por el método de microdilución.

Concentración mg/mL	% de crecimiento	Diámetro botón (µm)	UFC/mL
Gluconato de Clorhexidina 0.12%	0	0	0
0	100	2200	100
1	0	0	0
2	0	0	10
3	0	0	6
4	0	0	3
5	0	0	0
6	0	0	0
7	0	0	0
8	0	0	0
9	0	0	0
10	0	0	0

Fuente: Ficha de recolección de datos.

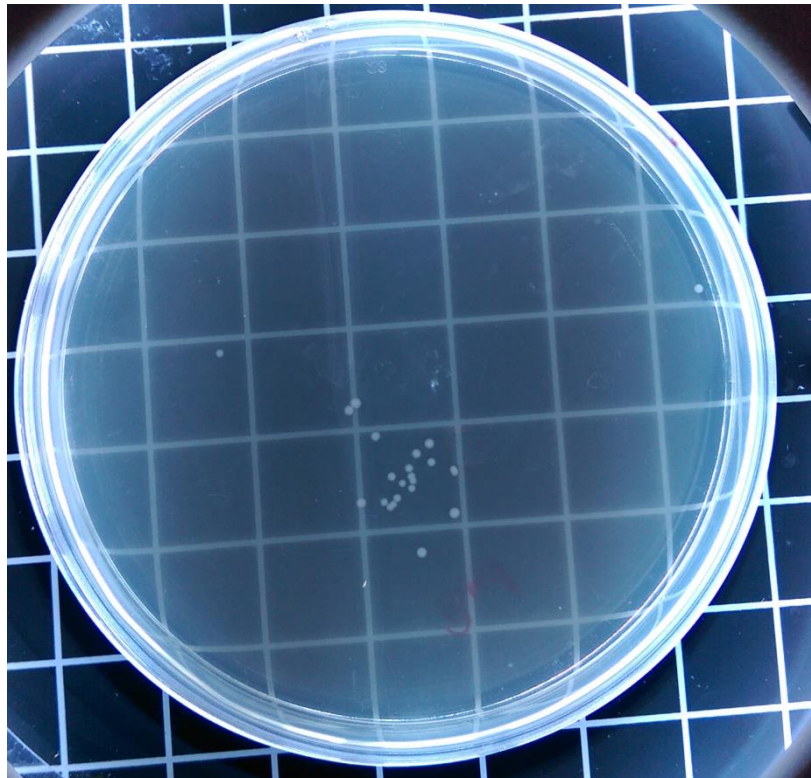


Figura 3. Fotografía del control de crecimiento de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 después de la siembra en agar Mueller Hinton a partir de los pocillos del método de microdilución.

IV. DISCUSIÓN

En la presente investigación nos propusimos evaluar el efecto *in vitro* del extracto etanólico de *Azadirachta indica* (NEEM) sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 bacteria involucrada en el inicio y progresión de la caries dental. *Azadirachta indica* (NEEM) es una especie vegetal que si bien es cierto no es nativa del territorio Peruano, se ha adaptado muy bien a las condiciones geoambientales de la región Piura. Es una planta que se suele utilizar como árbol ornamental o de sombra. Esta planta es encontrada en el campus de la Universidad César Vallejo – Filial Piura alrededor de sus campos deportivos. Revisando diversos artículos científicos se encontró que en algunos países se le reconoce como planta medicinal pero a pesar de esto en nuestro país pocos estudios se han realizado para demostrar tales bondades.

Evaluando las diez concentraciones preparadas del extracto etanólico de *Azadirachta indica* (NEEM) se encontró que todas las concentraciones inhibían *in vitro* el crecimiento de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Pero la mayor inhibición se observó en la concentración de 9000 µg/mL en la cual se obtuvo un halo de inhibición promedio de 16.7 mm utilizando el método de discodifusión. Estos resultados se relacionan con el obtenido por López G. (2014). En su investigación titulada “Evaluación *in vitro* del efecto antibacteriano de la *Camellia sinensis* (té verde) frente al *Streptococcus muntans* (ATCC 25175) quién utilizando el mismo método encontró un halo de inhibición promedio de 19.72 mm para el extracto evaluado. También se relacionan con la investigación de Abanto V. quien determinó el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* (TARA) sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 obteniendo a la concentración de 80% (mayor concentración evaluada) un mayor halo de inhibición que alcanzó los 14.8mm. Esta cercanía en el resultado se pudo deber a varios aspectos pero principalmente a que se ha trabajado con la misma cepa certificada, el mismo método y bibliográficamente se ha visto que los principios activos con capacidad antibacteriana tanto en el NEEM como en el té verde son los compuestos fenólicos y polifenólicos.

Mustafa M. (2016) en su investigación titulada, eficacia Antibacteriana de Neem (*Azadirachta indica*) Extracto contra *Enterococcus faecalis*: Un estudio in vitro". Demostró que la inhibición era total y significativa frente a esta bacteria. Estos resultados contrastan y difieren con los obtenidos en la presente investigación pues se encontró que si bien es cierto había efecto inhibitorio de todas las concentraciones del extracto cuando se comparó con la inhibición generada con el control positivo gluconato de clorhexidina no había significancia estadística. Si bien es cierto la planta utilizada por Mustafa es la misma de la presente investigación los resultados diferentes se pudieron deber a que se sabe que la cantidad y calidad de los principios activos de las plantas está relacionado con el espacio geográfico donde se cultiva la planta. También se debe tener en cuenta que el evaluó el efecto del Neem sobre *Enterococcus faecalis* un microorganismo con características metabólicas diferentes a las de *S. mutans* lo que pudo haber influido en el distinto resultado obtenido.

Para fundamentar la utilidad del efecto antibacteriano del *Azadirachta indica* sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 encontrado utilizamos los resultados obtenidos por Wolinsky L. (1996) en su investigación titulada efecto inhibitor del extracto acuoso *Azadirachta indica* (Neem) sobre las propiedades bacterianas que influyen en la formación de placas *in vitro*"; donde nos explica que los principios activos del Neem inhiben o impiden la síntesis de glucano insoluble responsable de la formación de la placa dentobacteriana y por ende de la adhesión de *Streptococcus mutans* a la superficie dentaria.

Respecto a la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB), los resultados muestran que ambas se encontraron por debajo de la menor concentración evaluada que fue 1000 µg/mL, esto se relaciona parcialmente con los resultados obtenidos por Abanto V. quien determinó que la CMI de la tara sobre *S. mutans* fue al 40% y se sabe que las concentraciones porcentuales tiene menor eficacia que las concentraciones volumétricas de los extractos, considerando además que el evaluó una concentración acuosa mientras que la presente investigación evaluó extracto etanólico.

V. CONCLUSIONES

1. El extracto alcohólico *Azadirachta Indica* (Neem) tiene efecto inhibitorio in vitro sobre la viabilidad de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.
2. La concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto alcohólico *Azadirachta Indica* (Neem) sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 fue < a 1000 µg/mL.
3. La concentración mínima bactericida (CMB) del extracto alcohólico de *Azadirachta Indica* (Neem) sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 fue < a 1000 µg/mL.
4. Existe efecto inhibitorio in vitro del extracto alcohólico de *Azadirachta Indica* (Neem) sobre *Streptococcus mutans* pero este efecto es estadísticamente no significativo cuando se compara con el gluconato de clorhexidina al 0.12%.

VI. RECOMENDACIONES

1. Continuar con la línea de investigación de la utilización de productos vegetales para la búsqueda de principios activos con actividad antibacteriana sobre microorganismos de interés oral.
2. Realizar la continuación de la presente investigación caracterizando fitoquímicamente a la planta *Azadirachta Indica* (Neem).
3. Determinar el grado de toxicidad de los principios activos de *Azadirachta Indica* (Neem) a fin de establecer si puede ser utilizado como fitoterápico en seres humanos.

VII. REFERENCIAS

1. Ministerio de Ambiente. Quinto informe Nacional ante el Convenio sobre la diversidad Biológica. Proyecto PNUD – GEF. Viceministerio de Desarrollo Estratégico de los Recursos Naturales. Dirección General de Diversidad Biológica. 2014, Lima. Perú.
2. Font Quer P. Plantas medicinales: El Dioscórides renovado. 3ra ed. Barcelona España: Labor. 1992: 98-100.
3. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales *Valeriana pilosa*, *Hesperomeles ferruginea*, *Myrcianthes rhopaloides* y *Passiflora manicata*, frente a microorganismos patógenos y fitopatógenos. 2008. . [en línea]. Colombia: Biblioteca del departamento de Microbiología Industrial; [fecha de acceso 05 de febrero del 2015]. disponible en: <http://jbbrepositorio.metabiblioteca.org/bitstream/001/608/1/Evaluaci%C3%B3n%20de%20la%20actividad%20antimicrobiana%20de%20los%20extractos%20etan%C3%B3licos%20y%20aceites%20esenciales%20de%20las%20especies%20vegetales.pdf>
4. El Arbol del nim: establecimiento y aprovechamiento en la huasteca potosina. Inifap. Disponible en: <http://www.campopotosino.gob.mx/modulos/Docs-descargar/FOLL.%20TEC.%20003.pdf>
5. Medicinal.and.Aromatic.Plants.vol.5.Neem.The.Divine.Tree.Azadirachta.indica- H. S Puri 2003
6. García C. Actividad antibacteriana de extractos vegetales en cepas hospitalarias de *Staphylococcus aureus* Resistencia múltiple. [Tesis de Doctoral]. México. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna. 2006
7. Wall M, Wani M. Camptothecin. Discovery to clinic. Ann N Y Acad Sci. 1996; 803: 1-12.
8. Gabriela del Pilar López Rodríguez, “Evaluación in vitro del efecto antibacteriano de la camellia sinensis (té verde) frente a Streptococcus

- mutans (ATCC 25175) y al *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556) Tesis para optar el título profesional de Cirujano dentista, Lima – Perú 2014.UPC
9. Bussmann R, Glenn A, Sharon D. Antibacterial activity of medicinal plants of Northern Perú – can traditional applications provides leads for modern science. Indian Journal of Tradicional Knowledge. 2010
 10. Mustafa M. Division of Endodontic, Department of Conservative Dental Sciences, College of Dentistry, Prince Sattam Bin Abdulaziz University, P.O.BOX: 153, AlKharj - 11942 Kingdom of Saudi Arabia
 11. Wolinsky LE, Mania S, Nachnani S, Ling S. Section of Oral Biology, University of California, School of Dentistry, Los Angeles 90095-1668, USA.
 12. Taylor Pitágoras Purga Peña “Efectividad antibacteriana “in vitro” del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) sobre flora salival” Lima- Perú. 2013 UNSM
 13. Torres Chati Jani “Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de *Luma chequen* (molina) a. gray “arrayán” frente a patógenos aislados de hemocultivos del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen,Lima - Perú.” (Lima – Perú 2014) USM
 14. Huari Guerrero Grace Medalith, “Efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de *minthostachys mollis* (muña) en *streptococcus mutans*” (Lima – Perú 2014) USM.
 15. Abanto Vilca, Magaly, “EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Caesalpinia spinosa* (TARA) SOBRE *Streptococcus mutans* ATCC 25175” (Trujillo) UNT.
 16. Plaantas medicinales y aromáticas : Fernando Muñoz
 17. Molezzi, A y Albedaña, A, Fitomedicina:Usos más comunes en Dermatología Argentina. 2002
 18. Plantas medicinales; el dioscórides renovado, Font Quer, Pío - Barcelona : CXL, 1033 p. Edición: 6 ed
 19. Microbiología médica. 25ª edición – Jawetz, Melnick y Adelberg – Editorial Mc Graw Hill – LANGE
 20. Investigación en plantas de importancia médica - Catalina Rivas-Morales,María Azucena Oranday-Cárdenas,María Julia Verde-Sta

21. Liébana Ureña, J. Microbiología oral (2 edición) – McGRAW – HILL – INTERAMERICANA
22. Jawetz E. Microbiología Médica. México. 5a ed. Ed. El Manual Moderno. 2002. Pág. 56- 67.
23. Negroni, Microbiología Estomatológica (Fundamentos y guía práctica) 2° Edición – Editorial Medica – Panamericana
24. Forbes B, Diagnóstico Microbiológico. Ed. Médica Panamericana. Pág 172. 2009
25. Odontología preventiva primaria- Norman O. Harris, Franklin García– Godoy – Editorial Manuel moderno.
26. Rev Cubana Estomatol v.45 n.1 Ciudad de La Habana ene.-mar 2008- La caries dental. Algunos de los factores relacionados con su formación
27. Cariología: el manejo contemporáneo de la caries dental - DIANA BERENICE CUADRADO VILCHIS JOSÉ FRANCISCO GÓMEZ CLAVEL
28. VILLA AAG. OBTENCIÓN DE ACEITES ESENCIALES Y EXTRACTOS ETANOLICOS. UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA, Colombia; 2014.
29. Fundamentos de ciencias básicas aplicados a la odontología – Editora Sandra Janeth Gutiérrez Prieto – Pontificia Universidad JAVIERANA – Bogotá – Facultad de Odontología.
30. Rodríguez, A y González, O. Fisiopatología de la caries dental. 2000 Universitas Odontológica

ANEXOS

ANEXO 1. Media de resultados obtenidos por el método de discodifusión.

Efecto del extracto de <i>Azadirachta indica</i> (neem)			
CONCENTRACIONES ($\mu\text{g/ml}$)	PROMEDIO DE REPLICACIONES	CONTROL POSITIVO CLORHEXIDINA	CONTROL SOLVENTE
1000	16.12	14.5	7.55
2000	13.5	17.3	9.37
3000	15.49	16.34	7.54
4000	14.36	16.55	8.37
5000	13.8	17.21	9.14
6000	15.15	16.37	7.37
7000	13.73	16.66	8.15
8000	13.73	17.15	8.36
9000	16.71	16.35	9.14
10000	16.71	16.27	7.15

ANEXO 2. Ficha de recolección de datos

Planta	Concentración del extracto en µg /mL	Replicaciones										Control +	Control -	Promedio de diámetro de halos de inhibición
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	G. Clorhexidina	SSFE	
Extracto de <i>Azadirachta Indica</i> (NEEM)	100													
	200													
	300													
	400													
	500													
	600													
	700													
	800													
	900													
	1000													

ANEXO 3. Proceso de obtención del material vegetal de *Azadirachta indica*



ANEXO 4. Proceso de obtención del extracto alcohólico de *Azadirachta indica*



ANEXO 5. Proceso de preparación de medios de cultivo.



ANEXO 6. Certificación de la Planta.



HERBARIUM PIURENSE Universidad Nacional de Piura

Constancia N° 004-2017

El que suscribe, Dr. J. Manuel Charcape Ravelo, docente del Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Piura, Director de la Unidad de Investigación de la Facultad de Ciencias y Director del Herbarium Piurense, deja

CONSTANCIA

Que el Sr. Wilmer Junior Cano Urteaga, estudiante del 10^{mo} ciclo de la Escuela de Estomatología la Universidad César Vallejo – Piura, identificado con DNI N° 70376249, con domicilio legal en Urb. Los Tallanes Mz. A Lote 05 – Piura, alcanzó una muestra botánica a este despacho para ser determinada en esta institución, manifestando que es para la realización de su Tesis titulada: Efecto del extracto etanólico de *Azadirachta indica* "neem" sobre la viabilidad *in vitro* de *Streptococcus mutans* ATCC25175. La muestra examinada resultó ser: ***Azadirachta indica* Jussieu 1830 MELIACEAE "neem"**

División: Angiospermae

Clase: Equisetopsida

Orden: Sapindales

Familia: Meliaceae

Género: *Azadirachta*

Especie: *A. indica* Jussieu 1830 MELIACEAE "neem"

Se le expide esta constancia a solicitud del interesado para los fines de realización de su tesis.

Piura, 07 de julio del 2017



Manuel Charcape Ravelo
Manuel Charcape Ravelo

c.c. Herbarium Piurense.

ANEXO 7. Matriz de consistencia

Tema	Problemas	Objetivos	Hipótesis	Variables	Método
EFECTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE AZADIRACHTA INDICA (NEEM) SOBRE LA VIABILIDAD IN VITRO DE STREPTOCOCCUS MUTANS ATCC 25175	Pregunta General	Objetivo General	El extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> (NEEM) tiene efecto antibacteriano <i>in vitro</i> sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.	EFECTO DEL EXTRACTO VIABILIDAD BACTERIANA	Diseño de Investigación: Explicativa Transversal Enfoque Cuantitativo Instrumentos: Guía de Observación Población: Muestra:
	¿Cuál es el efecto del extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> (NEEM) sobre la viabilidad <i>in vitro</i> de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175?	Evaluar efecto del extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> (NEEM) sobre la viabilidad <i>in vitro</i> de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175			
		Objetivo Específico Determinar la concentración mínima inhibitoria del efecto del extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> (NEEM) sobre la viabilidad <i>in vitro</i> de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175. Determinar la concentración mínima bactericida del efecto del extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> (NEEM) sobre la viabilidad <i>in vitro</i> de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 Por el método de microdilución y el método de siembra en superficie Determinar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> (NEEM) sobre la viabilidad <i>in vitro</i> de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 por el método de difusión en disco.			